

© О.О. Прищепа, 2014

УДК 616.853-08:615.213:616-092.9

О.О. ПРИЩЕПА

Одеський національний медичний університет, кафедра фізіології, Одеса

СТЕРОЇДНІ ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДОВГОТРИВАЛОГО ПЕНТИЛЕНЕТЕТРАЗОВОГО КІНДЛІНГУ

Нез'ясованими є патогенетичні механізми хронічного судомного синдрому, що спонукало автора провести низку дослідів, присвячених вивченню механізмів розвитку хімічного кіндлінга, індукованого тривалими (більше 90) введеннями пентиленететразолу (ПТЗ). Встановлено, що розвиток довготривалого ПТЗ кіндлінгу характеризується формуванням у тварин генералізованих клоніко-тонічних судом з подальшою тонічною екстензією задніх кінцівок, збільшенням тривалості судомного нападу і скороченням латентного періоду перших судомних реакцій. Формування кіндлінга прискорюється в разі екзогенного введення кортикостерону (КС). Протягом формування довготривалого кіндлінга значно зростає концентрація ендogenous КС в плазмі крові, а також в гіпокампі щурів. Автор висловлює припущення стосовно патогенетичної ролі глюкокортикоїдних гормонів зокрема та стероїдної системи в механізмах хронічного судомного синдрому.

Ключові слова: пентиленететразол, кіндлінг, кортикостерон, кров, гіпокамп, патогенетичні механізми

Вступ. Нами запропоновано нову модель хронічної судомної активності – модель довготривалого хімічного кіндлінга, індуковану тривалими (більше 90) введеннями пентиленететразолу (ПТЗ) [1]. Відомо, що за умов експериментальної моделі довготривалого електричного кіндлінга мигдалика, додатково до підвищення судомної активності, зниження судомного порога до дії конвульсантів та прогресивного розвитку генералізованих нападів [6], в щурів реєструються стійкі порушення поведінки, які проявляються епізодами післясудомної депресії, агресії [4, 8], порушенням моторної активності, когнітивних функцій, емоційного, стереотипного та інших розладів поведінки [5, 6, 10].

Результати клінічних спостережень дозволяють припускати взаємозв'язок судомних проявів у хворих на епілепсію з розвитком депресивних проявів поведінки [4, 6, 10], що також було підтверджено експериментально [2, 3, 11]. Клініцисти вважають депресивні стани пацієнтів такими, що провокують розвиток судом та можуть бути взагалі чинниками ризику виникнення захворювання [5, 8]. Важливо в такому разі простежити взаємозв'язок опосередкованих депресивні стани (та стресові механізми) гормонів гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи та вираженості судомного синдрому. Зважаючи на це, вивчена роль кортикостерону (КС) в механізмах розвитку довготривалого ПТХ кіндлінга через визначення характеру судомних реакцій після екзогенного його введення та визначення його вмісту в крові та гіпокампі за умов хронічного судомного синдрому. Вентральний гіпокамп був обраний зважаючи на його низький поріг виникнення судом [3].

Мета дослідження. Визначити патогенетичну роль КС за умов довготривалого ПТЗ-індукованого кіндлінгу через дослідження його впливу на розвиток кіндлінга та зміни його ендogenous концентрації в крові та гіпокампі за модельних умов.

Матеріали та методи. Досліди проведені за умов хронічного експерименту. Щурів утримували у стаціонарних умовах з природною 12-годинною зміною світла та темряви, вологістю 60 % і температурою $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Роботу з лабораторними тваринами проводили з дотриманням основних нормативних вимог щодо проведення лабораторних дослідів за участі експериментальних тварин.

Кіндлінг відтворювали за загальноприйнятою методикою [3] шляхом щоденних внутрішньо-очеревинних введень ПТЗ (30–35 мг/кг). Але здійснювали не більше 120 введень конвульсанту [1]. Тваринам 1-ї групи ПТЗ вводили щоденно, щурам 2-ї групи за 30 хв до щоденної ін'єкції ПТЗ підшкірно вводили КС (40 мг/кг). Тваринам контрольної групи (інтактні щури) за аналогічних умов вводили 0,9 %ізотонічний розчин хлориду натрію. Після введення ПТЗ протягом 10 хв спостерігали за характером судомних реакцій, вираженість яких оцінювали візуально за шестибальною шкалою [3].

Кожні 4 доби впродовж перших 24 діб досліду, а потім один раз на 10 діб передозуванням пентобарбіталу натрія (100 мг/кг) з кожної групи видаляли по 4 щури, в яких забирали кров, готували плазму крові центрифугуванням (10 хв при 15000 об/хв.), а також головний мозок, з якого виділяли гіпокамп (морський коник). В плазмі крові (100 мкл) та в супернатанті гіпокампу (100 мкл; гіпокамп видаляли при температурі $+4^\circ\text{C}$, після чого зразки тканин мозку знаходилися в сухому льоді при низькій температурі. Після обробки 5–1 мл розчину фосфатного буфера при $\text{pH}=7,0$ зразки гіпокампу гомогенізували при низькій температурі та центрифугували 10 хв при 5000 об/хв) визначали вміст КС застосовуючи ELISA метод (метод імуноферментного аналізу) із використанням чутливих до КС антитіл ("Enzo Life Sciences", США). Процедура визначення відповідала інструкціям фірми-виробника, згідно з чим кожне визначення проводили двічі. Абсорбцію антитіл проводили при довжині хвилі 405 нм.

Отримані результати обчислювали статистично. Мінімальну статистичну вірогідність визначали при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Починаючи з 9-ї ін'єкції ПТЗ, всі щури демонстрували міоклонічні здригання м'язів тулуба та передніх кінцівок з середньою інтенсивністю судомних реакцій при цьому $1,50 \pm 0,18$ бала. Після 15-го введення ПТЗ 55 % у щурів відзначалися клонічні скорочення м'язів тулуба, передніх і задніх кінцівок, що дорівнювало інтенсивності судом $2,7 \pm 0,3$ бала. Після 24-ї ін'єкції ПТЗ генералізовані напади реєструвалися у 100 % щурів, середня інтенсивність судом при цьому дорівнювала $4,2 \pm 0,4$ бала (табл. 1).

В подальшому конвульсанти вводили з корекцією дози, намагаючись досягти розвитку максимально виражених судомних нападів та запобігати одночасно гибелі тварин. Щури демонстрували генералізовані клоніко-тонічні напади, в тому числі й повторні, з падінням на бік, вегетативними розладами та тривалою післясудомною депресією. Інтенсивність судом в більшості щурів перевищувала 4 бали. Тривале застосування ПТЗ змінювало характер судом – у щурів переважав тонічний компонент з тонічною екстензією задніх кінцівок, а також збільшувалася тривалість судомного нападу і скорочувався латентний період перших судомних реакцій (див. табл. 1).

Таблиця 1

Вплив кортикостерону на показники ПТЗ-індукованого довготривалого кіндлінгу

Групи тварин	Досліджувані показники ($M \pm m$)		
	Латентний період перших судом, хв	Тривалість судом, сек	Інтенсивність судом, бали
Через 15 діб досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$4,7 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,3$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$2,9 \pm 0,3\#$	$5,9 \pm 0,6\#\#\#$	$4,2 \pm 0,4\#\#$
Через 24 доби досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$3,6 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,4$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$2,1 \pm 0,2\#\#\#$	$5,6 \pm 0,6\#\#\#$	$4,5 \pm 0,4$
Через 30 діб досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$3,2 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,5 *$	$4,3 \pm 0,4$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$1,9 \pm 0,2\#\#$	$6,7 \pm 0,6\#$	$4,6 \pm 0,4$
Через 60 діб досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$2,1 \pm 0,2 *$	$23,6 \pm 2,4 ***$	$3,9 \pm 0,3$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$1,7 \pm 0,2$	$41,3 \pm 3,9\#\#\#$	$4,5 \pm 0,4$
Через 90 діб досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$1,9 \pm 0,2 *$	$25,1 \pm 2,7 ***$	$4,4 \pm 0,4$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$1,9 \pm 0,2$	$36,2 \pm 3,5\#$	$4,5 \pm 0,4$
Через 120 діб досліджу			
1. Кіндлінгові щури	$2,0 \pm 0,2 *$	$24,3 \pm 2,8 ***$	$4,3 \pm 0,4$
2. Кіндлінг + кортикостерон	$1,9 \pm 0,2$	$34,7 \pm 3,6\#$	$4,5 \pm 0,4$

Примітки: * – $p < 0,05$ та *** – $p < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими у щурів після 24-го введення ПТЗ; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ та ### – $p < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими у щурів без введення КС (у всіх випадках застосовували статистичний критерій ANOVA та Ньюман-Кулз).

У відповідь на 15-е введення ПТЗ інтенсивність судом у щурів, яким завчасно вводили КС, у 1,6 разу перевищувала відповідний показник у кіндлінгових щурів без введення КС ($p < 0,01$). Латентний період перших судом (у 1,6 разу, $p < 0,05$), а також їх тривалість (у 2,6 разу, $p < 0,001$) відрізнялися від таких показників у кіндлінгових щурів без введення КС. Виявлені показники судомного синдрому залишалися вірогідними в щурів обох груп протягом 120 діб досліджу (див. табл. 1).

У відповідь на 15 введення епілептогену вміст КС в крові щурів дорівнював $25,55 \pm 2,55$ нг/мл, що виявилось на 23 % більше порівняно з відповідним показником в крові інтактних щурів ($p > 0,05$, табл. 2).

В той же проміжок часу вміст КС в гіпокампі також порівняли з аналогічним показником в контрольних вимірюваннях ($p > 0,05$). Після 24-ї ін'єкції ПТЗ вміст КС в крові та тканині гіпокампа становив $29,17 \pm 2,98$ нг/мл та $2,57 \pm 0,32$ нг/г, відповідно, що було на 47 % ($p < 0,05$) та на 23 % ($p > 0,05$) більше аналогічних контрольних показників. Через 30 діб досліджу вміст КС у крові та гіпокампі кіндлінгових щурів в 2 рази та в 4 рази (в обох випадках $p < 0,001$), відповідно, перевищував такий самий показник у інтактних щурів (табл. 2). Подібні розбіжності досліджуваних показників, які висвітлили суттєве переважання ендogenous вмісту КС, реєструвалися до 120-ї доби досліджу.

Таблиця 2

Концентрації кортикостерону в крові та тканині гіпокампі в щурів із ПТЗ-індукованим довготривалим кіндлінгом

Групи тварин	Досліджувані показники концентрації кортикостерону (М±m)	
	в крові (нг/мл)	в тканині гіпокампі (нг/г сухої тканини)
Через 15 діб дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	20,75±1,85	1,97±0,21
2. Кіндлінгові щури	25,55±2,55	2,44±0,31
Через 24 доби дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	19,90±1,90	2,09±0,23
2. Кіндлінгові щури	29,17±2,98*	2,57±0,32
Через 30 діб дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	21,15±2,15	2,14±0,17
2. Кіндлінгові щури	42,95±3,95***	8,71±0,91***
Через 60 діб дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	22,45±2,10	2,11±0,14
2. Кіндлінгові щури	56,38±6,11***	10,93±1,63***
Через 90 діб дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	21,70±1,85	2,21±0,18
2. Кіндлінгові щури	82,61±8,38***	12,56±1,29***
Через 120 діб дослідіду		
1. Контроль (інтактні щури)	23,25±2,15	2,13±0,19
2. Кіндлінгові щури	86,76±9,18***	12,71±1,46***

Примітки: * – $p < 0,05$ та *** – $p < 0,001$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими у щурів відповідних контрольних груп.

Таким чином, отримані дані висвітлюють просудомний ефект КС, який прискорює формування кіндлінгових генералізованих судом після 15 введення ПТЗ. Інтересно, що подальше формування довготривалого ПТЗ-індукованого кіндлінга характеризувалося суттєвим збільшенням вмісту КС у крові та тканині гіпокампі. Вміст КС у крові та гіпокампі перевищував відповідні контрольні показники, починаючи з 30-ї ін'єкції ПТЗ – саме в той проміжок часу ми відзначили гіпокінезію тварин в тесті «відкрите поле» [1] та порушення плавальної поведінки [2], які загалом свідчать про початок формування в щурів характерних для депресії змін поведінки. Такі дані дозволяють визначити єдині механізми формування депресії та хронічного судомного синдрому, що має клінічні [4, 8, 10] та експериментальні [5, 11] підтвердження.

Щодо патофізіологічних механізмів прискорення епілептогенезу під впливом КС, то, ймовірно, глюкокортикостероїди безпосередньо впливають на утворення мозку з найнижчим судомним порогом – миг-

далик та гіпокамп: подібне припущення підтверджується зростанням вмісту КС саме в гіпокампі при довготривалому ПТЗ кіндлінзі. Додатковим підтвердження цього є показане прискорення формування електричного кіндлінгу мигдалика під впливом КС [7]. Клінічні дослідження виявили порушення ультраструктури гіпокампі та його об'єму в пацієнтів зі стресом, травмою або іншими патологічними станами, що супроводжуються тривалим зростанням вмісту глюкокортикоїдів у крові [9].

Висновки. Таким чином, розвиток ПТЗ кіндлінга у щурів прискорюється під впливом екзогенного введення КС. При формуванні довготривалого ПТЗ кіндлінга вміст ендogenous КС у крові та гіпокампі значно зростає, що дозволяє припустити патогенетичну роль стероїдної системи загалом та КС, зокрема, в механізмах ПТЗ-індукованого хронічного судомного синдрому. Зростання вмісту КС, ймовірно, є одним із доказів формування депресивного стану протягом відтворення довготривалого кіндлінгу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Прищепа Е.А. Изменения двигательной, исследовательской активности и эмоционального поведения животных в условиях долговременного химического киндлинга / Е.А. Прищепа // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. — 2012. — №2. — С. 30—38.
2. Прищепа О.О. Зміни плавальної поведінки щурів за умов довготривалого пентилентетразолового кіндлінгу / О.О. Прищепа // Одеський мед. журн. — 2013. — №3 (137). — С. 13—17.
3. Шандра А.А. Киндлинг и эпилептическая активность / А.А. Шандра, Л.С. Годлевский, А.И. Брусенцов. — Одесса: Астропринт, 1999. — 191 с.
4. Depressive symptoms in epilepsy: prevalence, impact, etiology, biological correlates and effect of treatment with antiepileptic drugs / J.M. Miller, R.P. Kustra, A. Vuong [et al.] // Drugs. — 2008. — № 68 (11). — P. 1493—509.

5. Jobe P.C. Common pathogenetic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective / P. C. Jobe // *Epilepsy Behav.* — 2003. — Vol. 4, Suppl. 3. — S. 14—24.
6. Kalynchuk L.E. Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy / L.E. Kalynchuk // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2000. — Vol. 24, № 7. — P. 691—704.
7. Karst H. Episodic corticosterone treatment accelerates kindling epileptogenesis and triggers long-term changes in hippocampal CA1 cells, in the fully kindled state / H. Karst, E.R. de Kloet, M. Joels // *Eur. J. Neurosci.* — 1999. — Vol. 11. — P. 887—898.
8. Major depression is a risk factor for seizures in older adults / D. Hesdorffer, W. Hauser, J. Annegers [et al.] // *Ann Neurol.* — 2000. — Vol. 47. — P. 246—249.
9. McEwen B.S. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders / B.S. McEwen, A.M. Magarinos // *Hum. Psychopharmacol.* — 2001. — Vol. 16. — P. 7—19.
10. Oxbury S.M. Neuropsychological deficits in temporal lobe epilepsy / S.M. Oxbury, J. Oxbury, C.E. Polkey [et al.]. — *Intractable Focal Epilepsy.* — London : WB Saunders, 2004. — P. 377—391.
11. Sankar R. Neurobiology of Depression as a Comorbidity of Epilepsy / R. Sankar, A. Mazarati // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / Noebels J.L., Avoli M., Rogawski M.A. [et al.] Eds. — Bethesda : National Center for Biotechnology Information, 2012. — P. 207—233.

O.O. PRISHCHENKO

Odesa National Medical University, Department of Physiology, Odesa

PROLONGED PENTYLENETETRAZOL KINDLING STEROID PATHOGENETIC MECHANISMS

Chronic convulsive syndrome pathogenetic mechanisms remain unclear that gave to author the idea to provide series of experiments devoted to investigate the mechanisms of chemical kindling development induced by prolonged (above 90) pentylenetetrazol (PTZ) injections. PTZ prolonged kindling development characterized by generalized clonic-tonic seizures forming in animals with their subsequent hindlimbs tonic extension, seizure attack prolongation and first seizure reactions latency reduction. Corticosterone (CS) exogenous administration accelerates kindling formation. Prolonged kindling characterized by endogenous CS level increase in rats' blood plasma and hippocampus. Author concludes about glucocorticoid hormones, especially steroid system pathogenetic importance in the chronic convulsive syndrome mechanisms.

Key words: pentylenetetrazol, kindling, corticosterone, blood, hippocampus, pathogenetic mechanisms

Стаття надійшла до редакції: 19.02.2014 р.